

10/530865 11 APR 2005

530,865

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出版

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2004 年 4 月 22 日 (22.04.2004)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2004/033675 A1

(51) 国際特許分類: C12N 9/02, 15/53, C12Q 1/68, 1/26,
C07K 16/40, G01N 33/15, 33/50, 33/53, 33/566, 33/569

(21) 国際出願番号: PCT/JP2003/013043

(22) 国際出願日: 2003 年 10 月 10 日 (10.10.2003)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2002-299284
2002 年 10 月 11 日 (11.10.2002) JP

(URADE, Yoshihiro) [JP/JP]; 〒606-0804 京都府 京都市 左京区下鴨松原町 4 3 グラン・シティオ下鴨四季彩館 5 0 3 Kyoto (JP). クバタ ブルーノ・キルンガ (KUBATA, Bruno, Kilunga) [CD/KE]; 00621 ナイロビンゴング・ロード、ムカイ・ドライブ・オフ、ミモザ・コート、アパートメント 8 Nairobi (KE). カブトゥトゥ ピウス・ザカイ (KABUTUTU, Pius, Zakayi) [CD/JP]; 〒565-0842 大阪府 吹田市 千里山東 2-1 6-1 0 ショウエイ・ハイツ 3 0 5 号 Osaka (JP). 野崎 智義 (NOZAKI, Tomoyoshi) [JP/JP]; 〒132-0035 東京都江戸川区 平井 4-2 2-2-1 1 4 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 河宮 治, 外 (KAWAMIYA, Osamu et al.); 〒540-0001 大阪府 大阪市 中央区城見 1 丁目 3 番 7 号 IMP ビル 青山特許事務所 Osaka (JP).

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人大阪バイオサイエンス研究所 (OSAKA BIOSCIENCE INSTITUTE) [JP/JP]; 〒565-0874 大阪府 吹田市 古江台 6 丁目 2 番 4 号 Osaka (JP). 国立感染症研究所所長が代表する日本国 (JAPAN AS REPRESENTED BY THE DIRECTOR-GENERAL OF NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES) [JP/JP]; 〒162-8640 東京都 新宿区 戸山一丁目 2 3 番 1 号 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): BR, CO, MX, US.

添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 裏出 良博

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: FLAVIN PROTEIN OF *TRYPANOSOMA CRUZI*, METHOD OF SCREENING VERMICIDE WITH THE USE OF THE SAME AND DIAGNOSTIC

(54) 発明の名称: クルーズトリパノソーマのフラビン蛋白質とそれを用いた駆虫薬スクリーニング方法と診断薬

(57) Abstract: It is intended to provide a method of diagnosing infection with Chagas disease by screening a vermicide for *Trypanosoma cruzi* which is the pathogen of Chagas disease. Using a flavin protein TcOYE specific to *Trypanosoma cruzi*, a vermicide efficacious against *Trypanosoma cruzi* is screened. Using the gene sequence of TcOYE and an antibody therefor, infection with *Trypanosoma cruzi* is diagnosed.

(57) 要約: シャーガス病の病原体であるクルーズトリパノソーマの駆虫薬をスクリーニングし、シャーガス病感染を診断する方法を提供する。クルーズトリパノソーマに特異的なフラビン蛋白質 TcOYE を用いて、クルーズトリパノソーマに有効な駆虫薬をスクリーニングする。さらに、TcOYE の遺伝子配列や抗体を用いて、クルーズトリパノソーマ感染を診断する。

WO 2004/033675 A1

明 細 書

クルーズトリパノソーマのフラビン蛋白質とそれを用いた駆虫薬スクリーニング
方法と診断薬

5

技術分野

この発明は、現在有効な治療法の無いクルーズトリパノソーマ感染症（シャー
ガス病）に対する、有効な駆虫薬の開発と簡便で特異性の高い診断法に関するも
のである。さらに詳しくは、この発明は、シャーガス病の病原体であるクルーズ
トリパノソーマに存在するフラビン蛋白質TcOYE、および、その遺伝子組換え蛋
白質を利用して、クルーズトリパノソーマに有効な駆虫薬を開発し、その薬効物
質の代謝速度（分解活性）を試験する方法に関するものである。さらに、TcOYE
の遺伝子配列や抗体を用いて、クルーズトリパノソーマ感染を簡便、且つ、特異
的に診断する方法に関するものである。

10

15

背景技術

シャーガス病は、クルーズトリパノソーマ (*Trypanosoma cruzi*) による寄生
虫感染症である（世界保健機構, Weekly Epidemiol. Res. 65: 257-264, 1990;
Coura J. R. et al., Trends Parasitol., 18:171-176, 2002; Teixeira, M. M.
et al., Trends Parasitol., 18:262-268, 2002）。この原虫はヒト以外にもイ
ヌ、ネコ、アルマジロなど種々の動物に感染しており、アメリカ合衆国の多くの
州、および中南米全域に分布している。ヒトの感染は主としてテキサス以南にみ
られ、中南米18カ国で報告されている。患者総数は1,600万～1,800万人と概算さ
れ、毎年21,000人が死亡し、30万人の新たな患者が発生している。そして、200
万～300万人の慢性期の感染患者が存在し、感染の危険性地域に住む人口は1億
2000万人にのぼる。

20

25

ヒトの血中に存在するクルーズトリパノソーマは、大きなキネトプラストを持
ち18～22 μ mの体長でC字型に彎曲した虫体の錐鞭毛期型であり、分裂や増殖はし
ない。ところが、筋肉、肝臓、脾臓、心臓などの細胞内では、直径2～4 μ mのや
や楕円形で大きなキネトプラストを有する無鞭毛期型となり、2分裂で増殖する。

この無鞭毛期型は上鞭毛期型や前鞭毛期型にもなるが最終的には錐鞭毛期型になる。これが媒介者のサシガメに吸われると、その体内で無鞭毛期型を経て発育終末トリパノソーマ型となり糞の中に現れる。昆虫の体内で発育するのに約10日を要する。

- 5 媒介者となるサシガメは比較的大きな昆虫で多くの種類が知られているが、アルゼンチンなど南米の南部に分布する *Triatoma infestans*、南米の北部および中米に分布する *Rhodnius prolixus*、ブラジルのアカモンサシガメ (*Panstrongylus megistus*) などの種が重要である。これらの昆虫に刺されると激しい痛痒があり、ヒトが刺し口を搔くとき、皮膚上に排出した昆虫の糞の中のトリパノソーマが傷口にすり込まれて感染する。サシガメは人家内に出没し、夜間吸血する。雌雄の
- 10 成虫、若虫、幼虫とも媒介者となる。

- 昆虫に刺されてクルーズトリパノソーマに感染すると、その部位にchagomaと呼ばれる赤い瘤ができる。その後1～2週間の潜伏期を経て発病する。急性症状は普通小児にみられる。高熱、発疹、リンパ節炎、肝脾腫大、顔面とくに片側性の
- 15 Romana徴候という眼瞼浮腫、心筋炎、髄膜脳炎などを起こし、2～4週間の経過で死亡する例もある。急性期を脱した小児は慢性紀に移行するが、成人は初めから慢性の経過をとることが多い。慢性期の主症状は心筋炎、心肥大、巨大結腸などである。

- シャーガス病の診断は、上記の特徴的な諸症状に注意することから始まり、血液やリンパ節穿刺などの塗抹・ギムザ染色標本を用いた原虫の形態学的検出、合成培地などを用いた原虫培養検査法、採取材料をラットやマウスなどに注射しその体内で増殖させる動物接種法、無感染サシガメに患者の血液を吸わせ2週間後に昆虫の腸管内で増殖した原虫を検索する媒介体診断法、あるいは、皮内反応、補体結合反応、蛍光抗体法などの免疫学的診断法が広く用いられている。しかし、
- 20 いずれの方法も熟練を要し、操作が煩雑であり、感度や特異性の点で問題がある。

- 25 シャーガス病の治療にはニフルティモックスやベンズニダゾールが用いられてきた (Docampo, R. & Moreno, S. N. S., FASEB J. 45巻、p 2471-2476, 1986年; Henderson, G. B., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85巻、p 5374-5378, 1988年; Docampo, R., Chem. Biol. Interactions, 73巻、p 1-27, 1990

年)。しかし、これらの薬剤は、感染初期のみに有効であり (Braga M. S., et al., Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo, 42巻、p 157-161, 2000年)、その作用点も活性酸素などのラジカルが関与することが示唆されている以外は不明である (Boveris, A. R. et al., Biochem J., 175:431-439, 1978; Boveris, A. et al., Comp. Biochem. Physiol., 61C:328-329, 1978; Docampo, R. & Stoppani, A. O., Arch. Biochem. Biophys., 197:317-321, 1979; Viode, C. N. et al., Biochem. Pharmacol., 57:549-557, 1999)。しかも、副作用が強く、発ガン性を持つ。そして、抗マラリア薬であるプリマキンも多少効果があるとされているが、他のトリパノソーマ症やリーシュマニア症に有効な薬剤はシャーガス病には無効であり、クルーズトリパノソーマに対するワクチンは開発されていない。つまり、現在、シャーガス病に真に有効な医薬剤は皆無である。従って、シャーガス病に対する薬剤開発のための新たな標的分子の探索が世界的に求められている (世界保健機構, TDR news 67: 15, 2002)。

一方、我々は、マラリア原虫やアフリカ睡眠病の病原体であるブルーシトリパノソーマ (*Trypanosoma brucei*) などの寄生性原虫が、睡眠誘発作用や血管拡張作用、免疫抑制作用を持つプロスタグランジン (PG) をアラキドン酸から生合成する代謝系を持ち、これらの原虫のPG合成系は哺乳類の酵素 (シクロオキシゲナーゼ) の阻害剤には反応しないこと、さらに、これらの原虫が宿主における寄生感染を持続させるためにPGを利用している可能性を報告してきた (Kubata B. K. et al., J. Exp. Med. 188: 1197-1202, 1998; Kubata B. K. et al., J. Exp. Med. 192: 1327-1337, 2000)。そして、ブルーシトリパノソーマの可溶性画分から、各種のPGの共通前駆体であるプロスタグランジン H_2 (PGH $_2$) をプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$) に還元するトリパノソーマPGF合成酵素 (TbPGFS) を精製して、その遺伝子とcDNAをクローニングして、TbPGFSがアルドケト還元酵素遺伝子族に属することを証明した (Kubata B. K. et al., J. Exp. Med. 192: 1327-1337, 2000)。しかし、細胞内寄生体をつくるクルーズトリパノソーマが、感染経路が異なり分類学的にも異なるマラリア原虫やブルーシトリパノソーマと同様に、PG生合成系を持つか否かは不明であった。

発明の開示

(発明が解決しようとする技術的課題)

本発明はシャーガス病に対する薬剤開発の新たな標的分子を提供し、クルーズトリパノソーマ感染症の治療薬のスクリーニング法や診断薬を提供することを目的とする。

5 本発明者は上記目的を達成するために鋭意研究を行ない、次のような知見を得たことに基いて本発明を完成させた。

1) クルーズトリパノソーマもプロスタグランジン (PG) をアラキドン酸から合成する代謝系を持ち、この原虫のPG合成系は哺乳類の酵素 (シクロオキシゲナーゼ) の阻害剤で阻害されない。クルーズトリパノソーマもブルーシトリパノソーマと同様に宿主における寄生感染を持続させるためにPGを利用している可能性
10 が高い。

2) クルーズトリパノソーマの可溶性画分に、NADPHまたはNADHの存在下に PGH_2 を $\text{PGF}_{2\alpha}$ に還元する酵素活性が存在し、その活性はトリパノソーマPGF合成酵素 (TbPGFS) に対する抗体で吸収されない。この酵素活性は、ブルーシトリパノソーマやリーシュマニアなどの他の寄生原虫、および、ヒトを含む哺乳動物には
15 存在せず、クルーズトリパノソーマに特異的な酵素活性であると考えられる。

3) クルーズトリパノソーマ可溶性画分より均一に精製した PGH_2 - $\text{PGF}_{2\alpha}$ 還元酵素は、当モルのFMNを含むフラビン蛋白質である。

4) その蛋白質のcDNAは、1,140塩基対の蛋白質翻訳領域を持ち、379アミノ酸残
20 基からなる分子量42,260の蛋白質をコードしている。

5) その予想アミノ酸配列に基づく相同性検索から、この酵素は、動物には存在しない旧黄色酵素 (Old yellow enzyme、NADPHデヒドロゲナーゼ) 遺伝子族に属する。従って、この酵素をTcOYEと命名した。

6) 得られたcDNAを用いて大腸菌で発現させ大量精製した遺伝子組換え型の
25 TcOYEは、クルーズトリパノソーマの可溶性画分より精製した酵素と同程度の比活性の PGH_2 - $\text{PGF}_{2\alpha}$ 還元酵素活性を示し、嫌気性条件下で、過酸化水素や過酸化ブチル、さらに、メナディオン、ベータ・ラパコン、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシドなどのトリパノソーマに対して致死性の化合物の還元反応を触媒する。

7) TcOYEは、メナディオオンやベータ・ラパコンなどのナフトキノン化合物を1電子還元してセミキノンラジカルに変換する。一方、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシドを基質とする場合は2電子還元を行なってラジカルは產生しない。

- 5 8) TcOYEに対するポリクローナル抗体は、クルーズトリパノソーマの可溶性画分に存在するPGH₂-PGF_{2α}還元酵素活性、メナディオオン、ベータ・ラパコン、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシドなどの化合物の還元酵素活性を、ほぼ完全に免疫沈降させる。

- 10 TcOYEは、ブルーシトリパノソーマやリーシュマニアなどの他の寄生原虫、および、ヒトを含む哺乳動物には存在しないので、クルーズトリパノソーマに特異的な駆虫剤の開発の良い標的になる。そして、遺伝子組換え型のTcOYEを用いた酵素反応によるスクリーニングでは、1電子還元を受けてラジカルを発生させる化合物はクルーズトリパノソーマに対する駆虫効果が期待され、2電子還元を受ける化合物はクルーズトリパノソーマにより容易に分解されることが予想できる。
- 15 さらに、TcOYEに対する抗体を用いた免疫学的な手法や、TcOYE遺伝子のヌクレオチド配列を利用したRT-PCR法などの分子生物学的な手法を用いたTcOYE蛋白質と遺伝子の検出は、クルーズトリパノソーマ感染症に対する特異性の高い簡便な診断法の開発に応用できる。

(その解決方法)

- 20 即ち、本発明は、クルーズトリパノソーマに由来する、プロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有するフラビン蛋白質(TcOYE)に関する。

1 態様によれば、本発明は、以下の(a)、(b)又は(c)の組換え蛋白質、
(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列を含む蛋白質

- 25 (b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質、

(c) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列の断片からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質に関する

る。

本発明は上記の蛋白質をコードする遺伝子にも関する。

1 態様によれば本発明は、配列番号 1 の塩基配列を含む DNA よりなる上記遺伝子に関する。

5 本発明は上記の蛋白質に対する抗体にも関する。

本発明は更に、クルーズトリパノソーマ感染の駆虫薬のスクリーニング方法であって、

(i) 上記の蛋白質及びプロスタグランジン H_2 を準備し、

(i i) NADPH 又は NADH 存在下にこれらと候補化合物を接触させ、

10 (i i i) プロスタグランジン H_2 のプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ への還元が阻害されるか否かを調べる、

ことを含む方法に関する。。

他の態様によれば本発明は、クルーズトリパノソーマ感染の駆虫薬のスクリーニング方法であって、

15 (i) NADPH 又は NADH の存在下に上記の蛋白質と候補化合物を接触させ、

(i i) 該化合物が該蛋白質による 1 電子還元によりラジカルを発生するか否かを測定する、

ことを含む方法に関する。

本発明は更に、クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

20 (i) 検体又は検体抽出物を上記の抗体と接触させ、

(i i) 抗原／抗体複合体が生成するか否かを調べる、

ことを含む方法に関する。

他の態様によれば本発明は、クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

(i) 検体又は検体抽出物を上記の遺伝子又はその断片と接触させ、

25 (i i) 両者がハイブリダイズするか否かを調べる、

ことを含む方法に関する。。

他の態様によれば本発明は、クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

(i) 検体から回収した DNA、あるいは検体中の mRNA から逆転写酵素により合成した cDNA を準備し、

(i i) このDNA又はcDNAを鋳型として用い、配列番号1のTcOYEのcDNAに含まれるヌクレオチド配列をセンスプライマーとアンチセンスプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応を行い、

(i i i) TcOYEのcDNAが増幅されるか否かを調べる、
5 ことを含む方法にも関する。

図面の簡単な説明

図1は、クルーズトリパノソーマの粗抽出液によるプロスタグランジンの産生を示すグラフである。

10 図2は、クルーズトリパノソーマ可溶性画分に存在するNADPH存在下の[1-14C]-PGH₂から[1-14C]-PGF_{2α}への還元反応の検出を示すシリカゲル薄層クロマトグラフィーの模写図である。

図3は、分子量42,000の位置に均一なバンドを示すクルーズトリパノソーマ精製酵素のSDSアクリルアミドゲル電気泳動像を示す模写図である。

15 図4は、クルーズトリパノソーマに存在するプロスタグランジンH₂-F_{2α}還元酵素の各精製段階での酵素の収量と精製倍率を示す表である。

図5は、クルーズトリパノソーマから精製したPGH₂-F_{2α}還元酵素の酸化状態での可視部の吸収スペクトルを示す。

図6は、遺伝子組換え型TcOYEの発現と各精製段階の標品のSDSアクリルアミドゲル電気泳動像を示す模写図である。

20 図7は、遺伝子組換え型TcOYEによる還元反応の基質特異性を示す表である。

図8は、TcOYEによるナフトキノン化合物の1電子還元により産生するセミキノンラジカルと二次的に酸素と反応して発生するスーパーオキシドアニオンラジカルの電子スピン共鳴スペクトルを示す。

25 図9は、ナフトキノン化合物やニトロヘテロサイクル化合物によるTcOYEのPGH₂-F_{2α}還元酵素活性の阻害を示すグラフである。

図10は、トリパノソーマの粗抽出液を用いた抗TcOYE抗体の特異性を示すウェスタンブロット分析図である。

図11は、抗TcOYE抗体によるクルーズトリパノソーマ可溶性画分中のPGH₂-F_{2α}還元酵素活性の免疫吸収を示すシリカゲル薄層クロマトグラフィーを示す模

写図である。

図 1 2 は、抗TcOYE抗体によるクルーズトリパノソーマの粗抽出液中のメナディオン、ベータ・ラパコン、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシドの還元酵素活性の免疫沈降を示す表である。

5 発明の詳細な記述

本発明はまず、クルーズトリパノソーマに由来する、NADPHまたはNADHの存在下にプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有するフラビン蛋白質 (TcOYE) に関する。

本発明はまた、以下の (a)、(b) 又は (c) の組換え蛋白質に関する。

- 10 (a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列を含む蛋白質、
- (b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質 (以下で「TcOYE変異体」と呼ぶことがある)、
- 15 (c) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列の断片からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質 (以下で「TcOYE断片」と呼ぶことがある)。

この蛋白質 (TcOYE) は以下のような性質を有する。

- (1) 当モルのフラビンモノヌクレオチド (FMN) を含み、分子量は約 4 2 0
- 20 0 0 である。
- (2) NADPH又はNADHの存在下にPGH₂をPGF_{2α}に還元する酵素活性を有する。
- (3) 過酸化水素、過酸化ブチル、メナディオン、ベータ・ラパコン、4-ニトロキノリン-4-オキシド、ニフルティモックス、フェナジンメソサルフェイト (5-メチルフェナジウム・メチル・サルフェイト)、メヴィノリン (2β, 6α-ジメチル-8α-(2-メチル-1-オキソプトキシ)-メヴィニックアシドラク
- 25 トン)、12-オキソ・フィトディエノイックアシッド (4-オキソ-5β-(2Z-ペンテニル)-2-シクロペンテン-1β-オクタノイックアシッド)、9-オキソ-10E, 12Z-オクタデカディエノイックアシッド、エコナゾル (1-[2-([4-クロロフェニル]メトキシ)-2-(2,4-ジクロロフェニル)エチル-1H-イミダゾ-

ル) 等も還元する

(4) 還元は基質が1電子還元を受けラジカルを発生する場合、及び2電子還元を受けラジカルを発生しない場合がある。

(5) PGH_2 を $\text{PGF}_{2\alpha}$ に還元するその酵素活性は抗TcOYE抗体で完全に吸収される。

(6) PGH_2 を $\text{PGF}_{2\alpha}$ に還元するその酵素活性は抗TbPGFS抗体で吸収されない。

本発明者はクルーズトリパノソーマから蛋白質TcOYEをコードするcDNAをクローニングすることに成功した。該cDNAは配列番号1の塩基配列を有する。従ってTcOYEは配列番号2の推定アミノ酸配列を有する。

この蛋白質 (TcOYE) はクルーズトリパノソーマから単離することにより製造することもできるが、遺伝子組換え技術を用いて製造することが好ましい。

本発明の蛋白質の製造に原核生物を用い得る。本発明の蛋白質の製造に適した原核生物としては、大腸菌K12株294等の大腸菌、枯草菌等のバチルス属、*Salmonella typhimurium* 及び *Serratia marcescens*等の腸内細菌、種々のシュードモナス属、及びストレプトマイセス属等を挙げることができる。

原核生物での遺伝子の発現を制御するのに適当なプロモーター配列としては、 β ラクタマーゼ、ラクトース系、アルカリホスファターゼ、及びトリプトファン (trp) プロモーター系等がある。tacプロモーターのようなハイブリッドプロモーターもまた適する。一般的にその塩基配列が公知の他の細菌性プロモーターも必要ないずれかの制限部位を提供するリンカー又はアダプターを用いて本発明のタンパク質をコードするDNAに連結し得る。

本明細書で用いる「遺伝子」という用語は、核酸配列を有し、上に記載した配列を有するいずれかの分子、例えばDNA又はRNAを言う。

本発明は、本発明による核酸分子を有するベクター、特にプラスミド、コスミド、ウイルス、バクテリオファージ、及び遺伝子操作で従来用いられる他のベクターにも関する。当業者に周知の方法を用いて様々なプラスミド及びベクターを構築することができる。例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. 及び Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley

Interscience, N.Y. (1989), (1994) に記載の技術を参照。本発明に従い好ましく用いられるプラスミド及びベクターには当業者に周知のものが含まれる。

好ましい態様では、ベクター中に存在する核酸分子を原核又は真核細胞中で遺伝子を発現させることができるコントロール配列に結合する。

5 「コントロール配列」という用語は、それらが結合するコード配列を発現させるに必要な制御DNA配列を言う。そのようなコントロール配列の性質は、宿主生物により異なる。原核生物では、コントロール配列は一般にプロモーター、リボソーム結合部位及びターミネーターを含む。真核生物ではコントロール配列は一般にプロモーター、ターミネーター及びある場合にはトランスアクチベーター又は転写因子を含む。「コントロール配列」という用語は最小でもその存在が発現に必要なすべての成分を含むことを意図し、更なる有用な成分をも含んでもよい。

10 「作動可能に結合した」という用語は、該成分がそれらの意図され方法で作用することを可能にする関係にある位置を言う。コード配列に「作動可能に結合した」コントロール配列は、コード配列の発現がコントロール配列と適合する条件下で達成されるような方法で結合される。コントロール配列がプロモーターである場合には、2本鎖核酸が好ましく用いられることは当業者に自明である。

20 従って本発明のベクターは好ましくは発現ベクターである。「発現ベクター」は、選択した宿主細胞を形質転換し、選択した宿主細胞中でコード配列を発現させるため用いることができる構築物である。発現ベクターは例えばクローニング、バイナリーベクター又はインテグレイティングベクターであり得る。発現は好ましくは翻訳可能なmRNAへの核酸分子の転写を含む。原核及び／又は真核細胞中での発現を確実にする調節要素は当業者に周知である。真核細胞の場合、それらは通常転写の開始を確実にするプロモーター、及び場合により転写の終了及び転写物の安定化を保証するポリAシグナルを通常含む。一般的に用いられるプロモーターは、ポリユビキチンプロモーター、及びアクチンプロモーターである。更なる調節要素は転写エンハンサーを含みうる。原核宿主細胞での発現を可能にする可能な調節要素は、例えばE. coliにおけるPL、lac、trp又はtacプロモーターであり、真核宿主細胞での発現を可能にする調節要素の例は、

酵母における AOX 1 又は GAL 1 プロモーター。哺乳動物及び他の動物細胞における CMV-、SV 40-、RSV-プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、CMV エンハンサー、SV 40 エンハサー又はグロビンイントロンである

Okayama-Berg の発現ベクター p c D V 1 (Pharmacia)、p C D M 8、p R c / C
5 MV、p c D N A 1、p c D N A 3 (In-vitrogen)、p S P O R T 1 (GIBCO
BRL) 等の適当な発現ベクターが当業者に知られている。該タンパク質を発現させるのに用い得る別の発現システムは昆虫システムである。そのようなシステムの 1 つにおいて、Autographa californica 核ポリヘドロシウイルス (AcNPV)
10 をベクターとして用いて Spodoptera frugiperda 細胞又は Trichoplusia
larvae 中で外来遺伝子を発現させる。本発明の遺伝子のコード配列をポリヘドリン遺伝子等のウイルスの非必須領域にクローニングし、ポリヘドリンプロモーターの調節下に置いてもよい。該コード配列を首尾よく挿入すると、ポリヘドリン遺伝子が非活性になり、コードタンパク質を欠いた組換えウイルスが得られるであろう。その組換えウイルスを用いて、Spodoptera frugiperda 細胞又は
15 Trichoplusia larva に感染させ、その中で本発明のタンパク質を発現させる
(Smith, J. Virol. 46 (1983), 584; Engelhard, Proc. Nat. Acad. Sci. USA
91 (1994), 3224-3227)。有利には本発明の上記ベクターは選択可能なマーカーを含む。

本発明はさらに核酸配列が宿主細胞にとって外来である、上記のベクター又は
20 本発明の遺伝子を含む宿主細胞に関する。

「外来」とは核酸分子が宿主細胞に関して異種であるか（これは異なった遺伝的背景を有する細胞又は生物に由来することを意味する）、或いは宿主細胞に関しては同種であるが、該核酸分子の天然に存在する対応物と異なる遺伝的環境にあることを意味する。これは、核酸分子が宿主細胞に関して同種であるなら、それは該宿主細胞のゲノムの天然の位置にはないこと、特に異なる遺伝子に取り囲まれていることを意味する。この場合、核酸分子はそれ自身のプロモーターの支配下にあるか、又は異種のプロモーターの支配下にあってもよい。宿主細胞中に存在する本発明によるベクター又は遺伝子は宿主細胞のゲノムに組み込まれていてもよく、染色体外にある形で保持されていてもよい。これに関し、本発明の遺

伝子はホモログスな組換えにより変異体遺伝子を回復し、又は創出するのに用いてもよい (Paszkowski編, Homologous Recombination and Gene Silencing in Plants, Kluwer Academic Publishers (1994))。

従って、本発明は本発明のベクター又は遺伝子を含む宿主細胞に関する。

- 5 宿主細胞は (古) 細菌、昆虫、菌類、植物、又は動物細胞等のいずれの原核又は真核細胞でありうる。好ましい菌類細胞は、例えば *Saccharomyces* 属の細胞、特に *Saccharomyces cerevisiae* の細胞である。

- 「原核」という用語は、本発明の蛋白質の発現のためにDNA又はRNAで形質転換又はトランスフェクトされ得るすべての細菌を含むことを意図する。原核
- 10 宿主は、例えば *E. coli*、*S. typhimurium*、*Serratia marcescens*、及び *Bacillus subtilis* 等のグラム陽性及びグラム陰性細菌を含み得る。「真核」という用語は、酵母、高等植物、昆虫、そして好ましくは哺乳動物細胞を含むことを意味する。組換え製造方法に用いる宿主によって、本発明のポリヌクレオチド
- 15 によりコードされる蛋白質はグリコシル化されるかもしれないし、グリコシル化されないかもしれない。本発明の蛋白質は、最初のメチオニンアミノ酸残基を有していても、有していなくてもよい。当業者に一般的に知られたいずれかの技術を用いて本発明の遺伝子を用いて宿主を形質転換又はトランスフェクトすることができる。更に、融合し、機能的に結合した遺伝子の調製方法及びそれらを例えば哺乳動物及び細菌中で発現させる方法は当業者に周知である (Sambrook,
- 20 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)。

本発明はまた以下の (a)、(b) 又は (c) の蛋白質をコードする遺伝子に関する。

- (a) クルーズトリパノソーマに由来する、NADPH又はNADHの存在下にプロスタグランジン H_2 をプロスタグランジン $F_{2\alpha}$ に還元する酵素活性を有するフラビン
- 25 ン蛋白質TcOYE

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(c) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロスタグランジ

ンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質

(d) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列の断片からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質

1 態様によれば配列番号2で表わされるアミノ酸配列を有する蛋白質をコードする遺伝子は、配列番号1の塩基配列を含むDNAよりなる。遺伝コードの縮重により多数の塩基配列が存在しうる。

本発明はさらに、

(a) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列を含む蛋白質、

(b) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質、又は

(c) 配列番号2で表わされるアミノ酸配列の断片からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質、に対する抗体にも関する。

これらの蛋白質を免疫源として使用して、それらに対する抗体を製造することができる。これらの抗体は、例えば、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体であり得る。本発明にはまた、キメラ、単鎖、およびヒト化抗体、さらにはまた、Fabフラグメント、またはFab発現ライブラリーの生成物も含まれる。当業界で既知の様々な方法を、そのような抗体およびフラグメントの製造に使用することができる。

本発明の配列に対応する蛋白質に対して生成される抗体は、蛋白質を動物に直接注入することにより、または蛋白質を動物、好ましくはヒトでない動物に投与することにより得ることができる。そのようにして得られた抗TcOYE抗体は、TcOYEの自体に結合し、PGH₂→PGF_{2α}還元酵素活性を完全に吸収する。この方法では、蛋白質の断片のみをコードする配列さえも、完全な天然の蛋白質を結合する抗体を製造するのに使用することができる。

モノクローナル抗体を調製するには、連続的な細胞系培養により産生される抗体を与える技術を全て使用することができる。例には、ハイブリドーマ技術(KohlerおよびMilstein、1975、Nature、256:495-497)、トリオ

ーマ(trioma)技術、ヒトB細胞ハイブリドーマ技術(Kozborら、1983、Immunology Today 4:72)、およびヒトモノクローナル抗体を製造するためのEBV-ハイブリドーマ技術(Coleら、1985、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy、Alan R. Liss, Inc.、77-96頁において)が含まれる。

本発明はクルーズトリパノソーマ感染の駆虫薬のスクリーニング方法であって、

- (i) 蛋白質TcOYE及びプロスタグランジンH₂を準備し、
- (ii) NADPH又はNADH存在下にこれらと候補化合物を接触させ、
- (iii) プロスタグランジンH₂のプロスタグランジンF₂αへの還元が阻害

されるか否かを調べる、

ことを含む方法に関する。

反応は例えば以下のように行う。好氣的条件下での反応は、NADPH産生系(100 μM NADP, 100 μMグルコース6リン酸, 1 unitのグルコース6リン酸脱水素酵素)、TcOYE、阻害剤を含む100mM リン酸緩衝液(pH7.0) 100 μlに、500 μM [1-¹⁴C]PGH₂溶液(2.04Gbpq/mmol; アセトン、DMSOあるいはジメチルエーテル・ジエチレングリコール溶液) 1 μlを加え、37℃2分間、反応を行なう。嫌氣的条件下での反応は、反応液を5分間アルゴンガスで置換したのち、100 μM NADPHあるいはNADHを加え、PGH₂溶液1 μlを加えた後、アルゴンガス中で37℃2分間、反応を行なう。

-20℃に冷却した反応停止液(ジエチルエーテル:メタノール:2Mクエン酸(30:4:1混液)) 250 μlと過剰量の無水硫酸ナトリウムを加えて反応を停止し、同時に、残った基質([1-¹⁴C]PGH₂)と酵素反応生成物([1-¹⁴C]PGF_{2α})をエーテルに抽出する。低温室内でエーテル層の一部(約50 μl)をシリカゲル薄層(メルク社製)に塗布し、-20℃の冷凍庫内で薄層クロマトグラフィー(展開溶媒:ジエチルエーテル:メタノール:酢酸(90:2:1混液))を行なう。展開後、イメージアナライザーFL2000(フジフォトフィルム)を用いて、薄層板のオートラジオグラフィーを取り、基質と生成物の比率を求めて酵素活性を計算する。

非標識PGH₂を用いた場合には、反応後の基質と生成物をLC-MS(液体クロマトグラフィー・マススペクトロメトリー; Waters Alliance LC-MS system, 2690

separation module, 996 photodiode array detector, ZQ4000 mass detector; Inertsil-ODS3 column) を用いて分離定量を行ない、同様に、基質と生成物の比率を求めて酵素活性を計算する。

還元が阻害されるか否かは、阻害剤の存在下と非存在下で上記の酵素反応を行
5 ない、阻害剤による反応速度の低下の有無を調べる。上記のようにクルーズトリ
パノソーマは宿主における寄生感染を持続させるためにプロスタグランジンを利
用している可能性が高いのでTcOYEの阻害剤はクルーズトリパノソーマの宿主に
おける寄生感染を阻止するのに使用できる可能性がある。

本発明はまたクルーズトリパノソーマ感染の駆虫薬のスクリーニング方法であ
10 って、

(i) NADPH又はNADH存在下にTcOYE蛋白質と候補化合物を接触させ、

(i i) 該候補化合物が該蛋白質による1電子還元によりラジカルを発生するか
否かを測定する

ことを含む方法に関する。

15 TcOYEと基質候補化合物を含む100mM リン酸緩衝液 (pH7.0) 1mlを5分間アルゴ
ンガスで置換して嫌氣的条件にする。その後、反応液に100 μ M NADPHあるいは
NADHを加え、37℃の嫌氣的条件下で反応を行ない、NADPHあるいはNADHの減少
を340nmの吸光度の減少で追跡する。

1電子還元によりラジカルを発生するか否かは次のようにして測定する。

20 TcOYEと基質候補化合物を含む5mM トリス塩酸緩衝液 (pH7.0) 100 μ lを5分間ア
ルゴンガスで置換して嫌氣的条件にする。その後、反応液に10mM NADPHあるいは
NADHを加え、25℃あるいは37度の嫌氣的条件下で3分間の反応を行なう。そ
の反応液の一部をElectron spin resonance測定装置 (JEOL X-band
spectrometer) で分析して、ラジカルの産生の有無を測定する。測定条件や分析
25 方法は、以下の論文に記載されている。発生したラジカルは酸素と反応して、ス
ーパーオキシドアニオンラジカル (Moreno S. N. J. et al., J. Biol. Chem.
259: 6298-6305, 1984) を産生してクルーズトリパノソーマを殺虫すると考え
られる。

本発明はさらにクルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

(i) 検体又は検体抽出物を上記の抗TcOYE抗体と接触させて、
(i i) 抗原／抗体複合体が生成するか否かを測定する
ことを含む方法に関する。

5 検体としてはトリパノソーマ・クルージーが感染した可能性のある患者より採取した血液、筋肉組織の生検試料、脳脊髄液などの体液などを診断に用いることができる。「検体抽出物」とは上記検体から抽出した蛋白質、DNA、又はRNA等をいう。

10 上記の検体を低浸透圧の緩衝液と反応させて、感染したトリパノソーマ・クルージーからTcOYEを抽出する。その抽出液を抗TcOYE抗体と反応させて、抗原抗体複合体が形成されるか否かを調べる。

又、組織切片や塗抹標本を抗TcOYE抗体と反応させ、適当な蛍光物質または酵素標識二次抗体と反応させて、トリパノソーマ・クルージーの局在を可視化することもできる。

15 抗原/抗体複合体の検出には、通常のウェスタンブロット分析や、固定化抗体を用いたELISA、あるいは、ラテックス凝集法などを用いることができる。組織切片や塗抹標本での検出には、一般に多用されている免疫組織化学染色の方法（酵素抗体染色や蛍光抗体染色）を用いる。

本発明はさらに、クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

20 (i) 検体又は検体抽出物をTcOYEをコードする遺伝子又はその断片と接触させ、

(i i) 両者がハイブリダイズするか否かを調べる
ことを含む方法に関する。

25 上記の検体よりDNAを抽出して、各種の制限酵素で切断した後、アガロースゲル電気泳動によりDNA断片を分離し、ナイロン膜に転写する。その転写膜を、放射性同位元素やジゴキシゲニン標識したTcOYEのcDNA又はRNAプローブと反応させ、プローブが結合する遺伝子の存在の有無を調べる（サザンブロット法）。或いは、上記の検体より抽出したRNAを用いて、同様の方法により、TcOYEのmRNAの存在の有無を調べる（ノザンブロット法）。

組織切片や塗抹標本でのTcOYE遺伝子やmRNAの検出には、放射性同位元素やジ

ゴキシゲニン標識したTcOYEのcDNA又はRNAプローブを用いたin situハイブリダイゼーション法を用いる。

本発明はさらに、クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

(i) 検体から回収したDNA、あるいは検体中のmRNAから逆転写酵素により合成したcDNAを準備し、

(ii) このDNAを鋳型として用い、配列番号1のTcOYEのcDNAに含まれるヌクレオチド配列をセンスプライマーとアンチセンスプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応を行い、

(iii) TcOYEのcDNAが増幅されるか否かを調べる、

ことを含む方法に関する。

例えば、TcOYEのcDNAに含まれるセンスプライマー(例えば、5'-ATGGCGACGTTCCCTGAACTCC-3') (配列番号8) とアンチセンスプライマー(例えば、5'-TTATTTGTTGTACGTCGGGTA-3') (配列番号9) を使用して、トリパノソーマ・クルージーが感染した少量の全血、筋肉組織、脳脊髄液などの体液から回収したDNAを鋳型DNAとして、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行ない、TcOYEのcDNAが増幅されるか否かを調べる。PCR法の条件は、例えば、DNA変性95℃5分の反応を1サイクル、増幅反応としてDNA変性95℃1分、プライマーの結合56℃30秒、DNAポリメラーゼのよる伸長反応72℃1分の反応を30サイクル行う。

以下に本発明を実施例により更に説明するが、本発明がこれら実施例に限定されるものではないことは勿論である。

実施例

実施例1

クルーズトリパノソーマに存在するプロスタグランジン合成系

昆虫体内での増殖型 (エピマスチゴート) のクルーズトリパノソーマYNIH株 (国立感染症研究所 (東京都新宿区戸山1-23-1) より入手) は、常法 (Nozaki T. et al., J. Biol. Chem., 276:6516-6523, 2001) により合成培地を用いて培養した。得られた原虫を低浸透圧処理により破壊し、アラキドン酸と反応させた後、産生されるPGを有機溶媒で抽出し、HPLCにより分離精製した後、市販の測定キットを用いて定量する (Kubata B. K. et al., J. Exp. Med.

188: 1197-1202, 1998) と、クルーズトリパノソーマの粗抽出液は、PGD₂、PGE₂、PGF_{2α}を活発に産生することがわかった（図1参照）。これらのPGの産生は、100°C 20分の熱処理で完全に消失するが、哺乳類でのPG産生を完全に抑制する3 μMアスピリンや42 μMインドメタシンでは全く影響されない。

5 実施例2

クルーズトリパノソーマに存在するプロスタグランジンH₂-F_{2α}還元酵素活性

40 μM [1-14C]-PGH₂を、アルゴンガス置換を行なった0.1Mリン酸緩衝液（pH7.0）中で、嫌気条件下に500 μM NADPHと共に37°C、2分間反応させる。クルーズトリパノソーマの可溶性画分を加えると、PGH₂はほぼ全てPGF_{2α}に変換される（図2参照）。しかし、熱変性させたクルーズトリパノソーマの可溶性画分を用いたり、NADPHを加えないと、この変換反応は起こらない。

10 実施例3

クルーズトリパノソーマに存在するプロスタグランジンH₂-F_{2α}還元酵素の精製と部分アミノ酸配列の決定

15 クルーズトリパノソーマの可溶性画分を硫酸分画にかけ20~80%飽和硫酸画分を回収した。そして、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー（HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラム、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）で分画する。活性画分を分子量3,000のカットオフ値のセントリコン濃縮器（ミリポア社製）で濃縮し20mMリン酸緩衝液（pH7.0）に透析した後、2M硫酸を含む20mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化した逆相カラムクロマトグラフィー（Resource PHE 逆相カラム、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）に吸着させ、0.1% Tween20を含む2Mから0Mへの硫酸の逆勾配で溶出した。活性画分を20mMトリス塩酸緩衝液（pH8.0）に透析した後、この緩衝液で平衡化したイオン交換樹脂カラム（HiPrep 16/60 DEAE イオン交換カラム、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）に吸着させ、0~400mM NaClの直線濃度勾配で溶出した。その活性画分を、再度、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー（HiLoad 16/60 Superdex 200 pg カラム、アマシャム・ファルマシア・バイオテク社製）にかけると、PGH₂-F_{2α}還元酵素活性の収量が約1%、約1630倍の精製倍率で、約700 nmol/分/mg蛋白質の比活性を示し、SDSアクリルアミドゲル電気泳動上、分子量42,000の

位置に均一なバンドを示す精製酵素が得られる（図3と図4参照）。

精製された P GH2 - P G F 2 α 還元酵素は黄色の色素を結合している。その可視領域の吸収スペクトルは、酸化状態で379nmと462nm付近に吸収極大を示す。そして、100 μ MのNADPHを加えて酵素を還元状態にすると、可視部の吸収スペクトルは消失する。つまり、本酵素はフラビンモノヌクレオチド（FMN）を、酵素1分子に対して1分子ずつ結合しているフラビン蛋白質である（図5参照）。

その精製酵素をリジルエンドペプチダーゼで処理し（Rosenfeld, J. et al., Anal. Biochem., 203:173-179, 1992）、逆相クロマトグラフィーで分離すると3本のペプチドが回収され、次のアミノ酸配列が決定できた。

ペプチドー 1 Asn Arg Ile Ile Met Ala Pro Leu Thr Arg
(配列番号3)

ペプチドー 2 Asp His Arg Ile Pro Val Tyr Phe Ala Ala
(配列番号4)

ペプチドー 3 Ile Ser Asn Leu Arg Tyr Asp Phe Glu Glu
(配列番号5)

実施例 4

TcOYEのcDNAクローニングと大腸菌を用いた遺伝子組換え蛋白質の発現

得られた3本のペプチドのアミノ酸配列をEMBL/GenBank/DDBJデータベースの中で検索すると、U31282の登録番号の1,686塩基対の長さの遺伝子（Catmull, J. and Donelson, J. E., EMBL/GenBank/DDBJデータベース, 1995、クルーズトリパノソーマ細胞内感染型で発見された酵母の旧黄色酵素遺伝子のホモログ遺伝子、クルーズトリパノソーマの還元酵素と記載）の予想蛋白質翻訳領域の中に、2本のペプチドと、もう1本のペプチドの1アミノ酸残基が変化したペプチドが見つかった。

クルーズトリパノソーマの還元酵素の蛋白質翻訳領域のヌクレオチド配列から、5'-末端にEcoRI制限酵素配列を加えたセンス・プライマーとして

5'-CGGAATTCATGGCGACGTTCCCTGAACTTC-3'（配列番号6）

を合成し、5'-末端にXhoI制限酵素配列を加えたアンチセンス・プライマーとして、

5'-CCGCTCGAGTTATTTGTTGTACGTCGGGTA-3' (配列番号7)

を合成した。

昆虫体内での増殖型のクルーズトリパノソーマより、塩酸グアニジン・フェノール法 (ISOGEN溶液、ニッポンジーン社製) を用いて全RNAを抽出し、オリゴdT
5 -アダプター・プライマー (タカラ酒造社製) とアニーリングさせ、エビアン・
ミエロプラストシス・ウイルス逆転写酵素 (タカラ酒造社製) を用いて一本鎖
cDNAを合成した。これに、上記のセンスとアンチセンスの合成プライマーを加えてPCR反応を行なうと、379アミノ酸残基からなる分子量42,260の蛋白質翻訳領域
を含むcDNAが増幅した (配列番号1及び2)。得られたcDNAのヌクレオチド配列
10 は6個所でU31282と異なり、その内、1ヶ所はアミノ酸残基の変化を伴っている。
そして、精製酵素を用いて決定した3本のペプチドのアミノ酸配列は、得られた
cDNAの蛋白質翻訳領域に完全に含まれていた。

得られたcDNAをpGEX-4T-1ベクター (アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) のEcoRI/XhoIサイトに挿入して蛋白質発現ベクターを作製した。

15 大腸菌BL21株をこのベクターを用いて形質転換させ、0.5mMイソプロピルーβ-D-チオガラクトシルピラノシドの存在下に7時間培養すると、グルタチオン
転移酵素との融合蛋白質として遺伝子組換え型TcOYEが大腸菌の可溶性画分に発現される。その後、この大腸菌を超音波破碎して抽出液を回収し、グルタチオン
アフィニティーカラム (グルタチオンSepharose 4B、アマシャム・ファルマシア・バイオテック社製) にかけて、融合蛋白質を樹脂に吸着させ、洗浄後、カラム
20 上でのスロンビン処理を行なって、遺伝子組換え型TcOYEを回収した。以上の方法により、高純度の遺伝子組換え型TcOYEを容易に大量精製することができた
(図6参照)。

実施例5

25 遺伝子組換え型TcOYEによる還元反応の基質特異性

精製した遺伝子組換え型TcOYEのPGH₂-F₂還元酵素活性は766nmol/分/mg蛋白質であり、クルーズトリパノソーマの可溶性画分より精製した標品と、ほぼ同じ比活性を示した。

アルゴン置換した0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.0) 中で500μMのNADPHあるいは

NADHの存在下に遺伝子組換え型TcOYEと反応させ、340nmの吸収スペクトルの減少を測定して、様々な化合物に対する基質特異性を測定すると、TcOYEは過酸化水素や過酸化ブチルも還元した（図7参照）。さらに、TcOYEは、トリパノソーマに対する駆虫効果を示す各種のキノン化合物やニトロ誘導体化合物（メナディオ
5 ン、ベータ・ラパコン、4-ニトロキノリン-4-オキシド、ニフルティモックス、
フェナジンメソサルフェイト（5-メチル-フェナジウム・メチル・サルフェイ
ト）、メヴィノリン（2 β , 6 α -ジメチル-8 α -(2-メチル-1-オキシプロトキ
シ)-メヴィニックアシドラクトン）、12-オキシ・フィトディエノイックアシ
ッド（4-オキシ-5 β -(2Z-ペンテニル)-2-シクロペンテン-1 β -オクタノ
10 イックアシッド）、9-オキシ-10E, 12Z-オクタデカディエノイックアシッド、
エコナゾル（1-[2-([4-クロロフェニル]メトキシ)-2-(2,4-ジクロロフェ
ニル)エチル-1H-イミダゾール]）も還元する。しかし、ベンズニダゾールやク
リスタルバイオレット（エヌ-[4[ビス[4-(ジクロロフェニル)-2-(1H-イミ
ダゾール-1-イルメチル)-1,3-ジオキソラン-4-イル-メトキシ]フェニル]ピ
15 ペラジン]）は還元しなかった（図7参照）。

TcOYEによる反応産物の電子スピン共鳴スペクトルをJEOL X-バンドスペクト
ロメーター（日本電子社製）を用いて測定すると（Moreno, S. N. J., et al.,
J. Biol. Chem. 259:6298-6305, 1984）、メナディオオンやベータ・ラパコンな
どのナフトキノン化合物は1電子還元されセミキノンラジカルを生成することを
20 示すシグナルが検出された。そして、発生したセミキノンラジカルは酸素と反応
して、原虫を殺すスーパーオキシドアニオンラジカルを生成した（図8参照）。
一方、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシド、メヴィノリン
などのニトロヘテロサイクル化合物を基質とする場合は2電子還元を受けラジカ
ルの生成は検出されない。

25 TcOYEにより還元されるナフトキノン化合物やニトロヘテロサイクル化合物は、
TcOYEによるPGH₂-F_{2 α} 還元酵素活性を用量依存的に阻害する。そして、ニフルテ
ィモックスによる阻害が最も強力であり、メナディオオン、ベータ・ラパコン、4
-ニトロキノリン-N-オキシドによる阻害は弱い（図9参照）。

実施例6

抗TcOYE抗体の製造

5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した遺伝子組換えTcOYE (300 μ g) 抗原を同量のフロイント完全アジュバント (ディフコ製) を混ぜて乳化し、乳濁液を作製した。抗原乳濁液を、雌の日本白兔 Kb1 の肩部の20箇所の皮下に投与して免疫した。その後、2週間おきに、4回、抗原を同量のフロイント不完全アジュバントで混ぜて乳化した乳濁液を、同量投与した。2回目の免疫4週間後、ウサギの耳静脈より採血した。血液を4℃で一晩静置して凝固させた後、遠心分離 (1000 X g、20分間) により血清を回収した。血清をプロテインAセファロースクロマトグラフィー (アマシャムファルマシアバイオテック社) により分離して、IgG画分を精製した。

実施例7

抗TcOYE抗体とそれを用いた薬物代謝活性の免疫吸収試験

精製した遺伝子組換え型TcOYEをウサギに免疫して得た抗体は、クルーズトリパノソーマの粗抽出液を用いたウェスタンブロット分析において、TcOYEのみと免疫交差反応を示した。そして、ブルーシトリパノソーマやリーシュマニアの粗抽出液中に免疫交差反応を示す蛋白質は無く、TbPGFSにも結合しない。逆に、遺伝子組換え型TbPGFSをウサギに免疫して得た抗体は、TcOYEを認識せず、クルーズトリパノソーマの粗抽出液中に免疫交差反応を示す蛋白質は無い (図10 参照)。

クルーズトリパノソーマの粗抽出液を用いた免疫吸収試験において、抗TcOYE抗体はPGH₂-F₂ α 還元酵素活性をほぼ完全に吸収するが、抗TbPGFS抗体はその活性を全く変えない (図11 参照)。そして、TcOYE抗体は、クルーズトリパノソーマの粗抽出液中のメナディオ、ベータ・ラパコン、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシドなどの化合物の還元酵素活性も、ほぼ完全に免疫沈降させた (図12 参照)。

以上の結果は、クルーズトリパノソーマの粗抽出液中のPGH₂-F₂ α 還元酵素活性とメナディオ、ベータ・ラパコン、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシドなどの化合物の還元酵素活性は、ほとんどがTcOYEにより触媒されていることを示す。

請 求 の 範 囲

1. クルーズトリパノソーマに由来する、プロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有するフラビン蛋白質 (TcOYE)。

5 2. 以下の (a)、(b) 又は (c) の組換え蛋白質。

(a) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列を含む蛋白質

(b) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質

10 (c) 配列番号 2 で表わされるアミノ酸配列の断片からなり、かつプロスタグランジンH₂をプロスタグランジンF_{2α}に還元する酵素活性を有する蛋白質

3. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質をコードする遺伝子。

4. 配列番号 1 の塩基配列を含む DNA よりなる請求の範囲第 3 項に記載の遺伝子。

15 5. 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質に対する抗体。

6. クルーズトリパノソーマ感染の駆虫薬のスクリーニング方法であって、

(i) 請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質及びプロスタグランジンH₂を準備し、

(i i) NADPH 又は NADH 存在下にこれらと候補化合物を接触させ、

20 (i i i) プロスタグランジンH₂のプロスタグランジンF_{2α}への還元が阻害されるか否かを調べる、
ことを含む方法。

7. クルーズトリパノソーマ感染の駆虫薬のスクリーニング方法であって、

(i) NADPH 又は NADH の存在下に請求の範囲第 1 項又は第 2 項に記載の蛋白質と候補化合物を接触させ、

25 (i i) 該化合物が該蛋白質による 1 電子還元によりラジカルを発生するか否かを測定する、
ことを含む方法。

8. クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

(i) 検体又は検体抽出物を請求の範囲第5項に記載の抗体と接触させ、

(ii) 抗原／抗体複合体が生成するか否かを調べる、

ことを含む方法。

9. クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

5 (i) 検体又は検体抽出物を請求の範囲第3項に記載の遺伝子又はその断片と接触させ、

(ii) 両者がハイブリダイズするか否かを調べる、

ことを含む方法。

10. クルーズトリパノソーマ感染の診断方法であって、

10 (i) 検体から回収したDNA、あるいは検体中のmRNAから逆転写酵素により合成したcDNAを準備し、

(ii) このDNA又はcDNAを鋳型として用い、配列番号1のTcOYEのcDNAに含まれるヌクレオチド配列をセンスプライマーとアンチセンスプライマーとして用いたポリメラーゼ連鎖反応を行い、

15 (iii) TcOYEのcDNAが増幅されるか否かを調べる、
ことを含む方法。

図 1

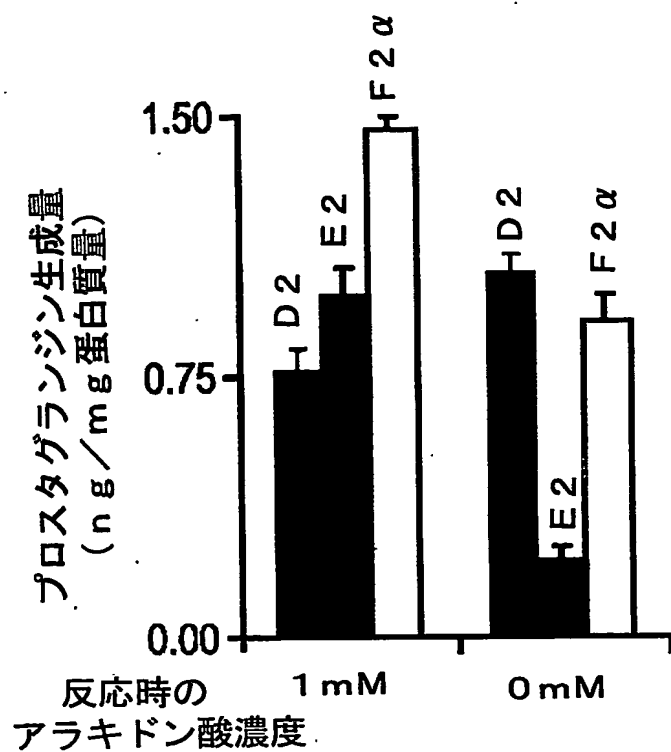
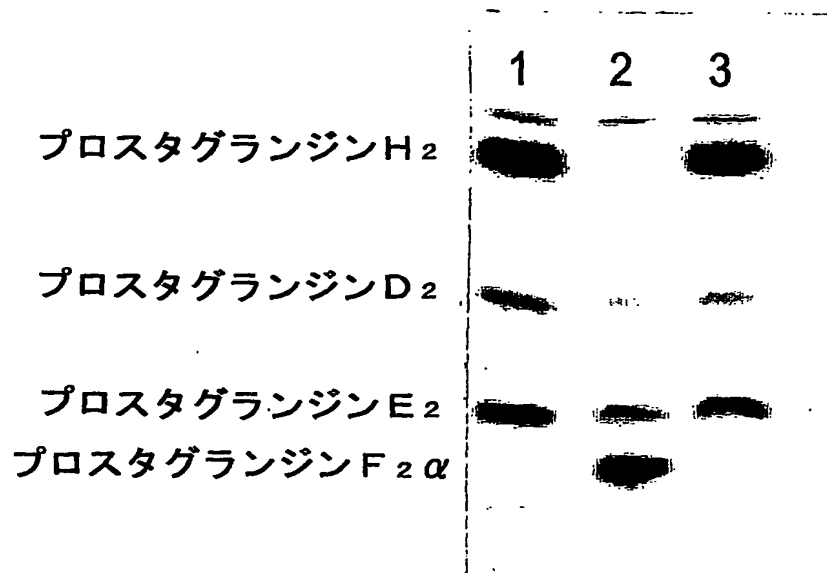
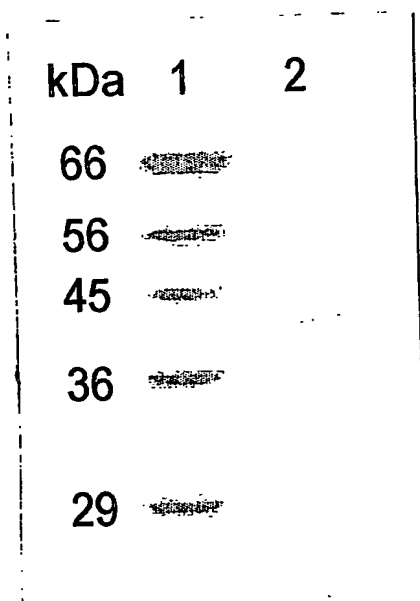


図 2



1. 酵素なし
2. クルーズトリパノソーマ抽出液
3. 熱処理後のクルーズトリパノソーマ抽出液

図 3



1. 分子量マーカー蛋白質
2. 精製酵素

4/12

図 4

精製段階	総蛋白質量 (mg)	酵素活性 (nmol/分)	比活性 (nmol/分/mg 蛋白質)	精製倍率
可溶性画分	171.0	154	0.9	1.0
20-80% 飽和硫酸 アンモニウム画分	127.0	150	1.2	1.3
スーパーデックス200	113.0	150	1.2	1.3
限外濾過クロマトグラム 疎水性クロマトグラム	8.0	170	25.0	28.0
DEAEイオン交換 クロマトグラム	2.8	180	64.0	71.0
スーパーデックス200 限外濾過クロマトグラム 2回目	0.3	210	700.0	778.0

図 5

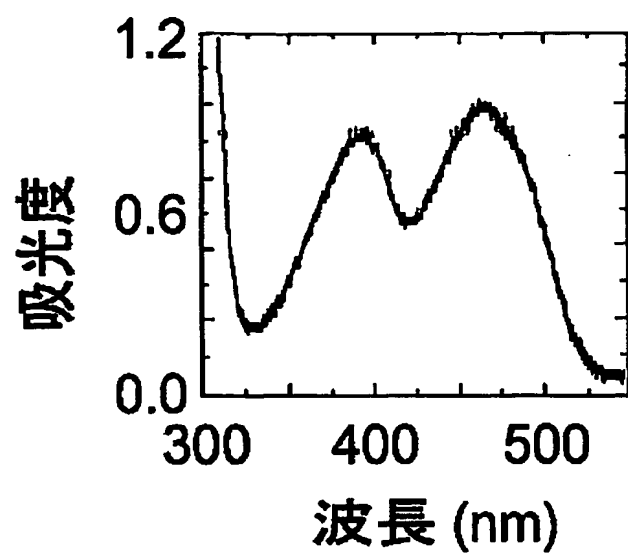
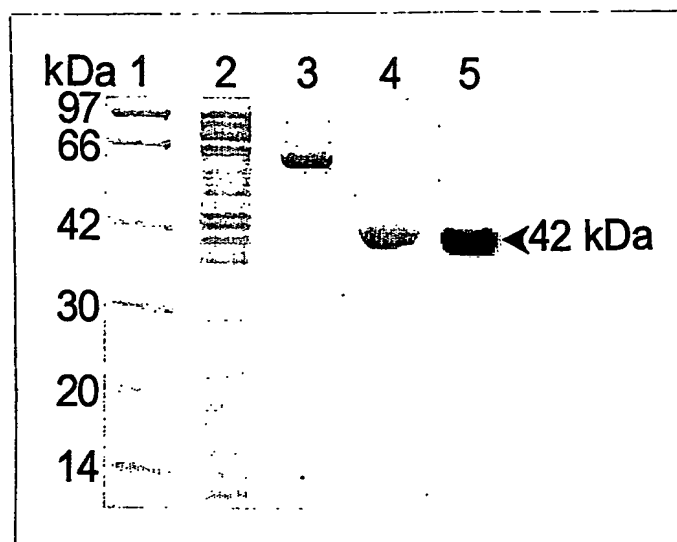


図 6



1. 分子量マーカー蛋白質
2. 形質転換後の大腸菌の粗抽出液
3. 遺伝子組換え型 T c O Y E を発現した大腸菌の粗抽出液
4. スロンビン処理により回収した遺伝子組換え型 T c O Y E
5. 遺伝子組換え型 T c O Y E の精製標品

7/12

図 7

遺伝子組換え型 TcOYE による還元反応の基質特異性

基質	補助因子 (10 μ M)	Km (μ M)	Vmax/比活性 (nmol/min/mg)
9,11-エンドペロキシドPGH ₂	NADH	—	554
	NADPH	5.0	766
ハイドロゲンペロキシド	NADPH	2.3	99
BHP ^a	NADPH	n. d.	282
メナディオ	NADH	—	499
	NADPH	0.82	700
ペータ・ラパコン	NADH	0.17	650
	NADPH	—	433
4-ニトロキノリン-N-オキシド	NADH	—	759
	NADPH	9.5	1110
ニフルティモックス	NADH	—	290
	NADPH	19.0	353
フェナジンメソサルフェイト ^b	NADPH	10.4	235
メヴィノリン ^c	NADH	n. d.	555
12-オキソ・			
フィトディエノイックアシッド ^d	NADPH	n. d.	152
9-オキソODE ^e	NADPH	n. d.	54
エコナゾール ^f	NADH	n. d.	43
ベンズニダゾール	—	n. d.	N. D.
ミオナゾール ^g	—	n. d.	N. D.
ケトコナゾール ^h	—	n. d.	N. D.
クリスタルバイオレット ⁱ	—	n. d.	N. D.
BHT ⁱ	—	n. d.	N. D.
BHA ^k	—	n. d.	N. D.

a: ティーブチル・ハイドロペロキシド, b: 5-メチルフェナジニウムメチルサルフェート, c: 2- β , 6- α -ジメチル-8- α -(2-メチル-1-オキソブトキシ)-メヴィニックアシッドラク톤, d: 4-オキソ-5- β -(2Z-ペンテニル)-2-シクロペンテン-1- β -オクタノイックアシッド, e: 9-オキソ-10E, 12Z-オクタデカディエノイックアシッド, f: 1-[2-([4-クロロフェニル]メトキシ)-2-(2,4-ジクロロフェニル)エチル-1H-イミダゾール], g: 1-[2,4-ジクロロ- β -(2,4-ジクロロベンジル)-オキソ]フェネチル]イミダゾール, h: シス-1-アセチル-4-[4-([2-(2,4-ジクロロフェニル)-2-(1H-イミダゾール-1-イルメチル)-1,3-ジオキサラン-4-イル]メトキシ)フェニル]ピペラジン, i: N-[4-[ビス[4-(ジメチルアミノ)フェニル]メチレン]-2,5-シクロヘキサジエン-1-イル]イデン-N-メチルメタンアミニウムクロライド, j: (2,6ジ-tert-ブチル-バラクレゾール), k: [2(3)-tert-ブチル-4-ヒドロキシアニゾール], N. D.: 未検出, n. d.: 未測定

図 8

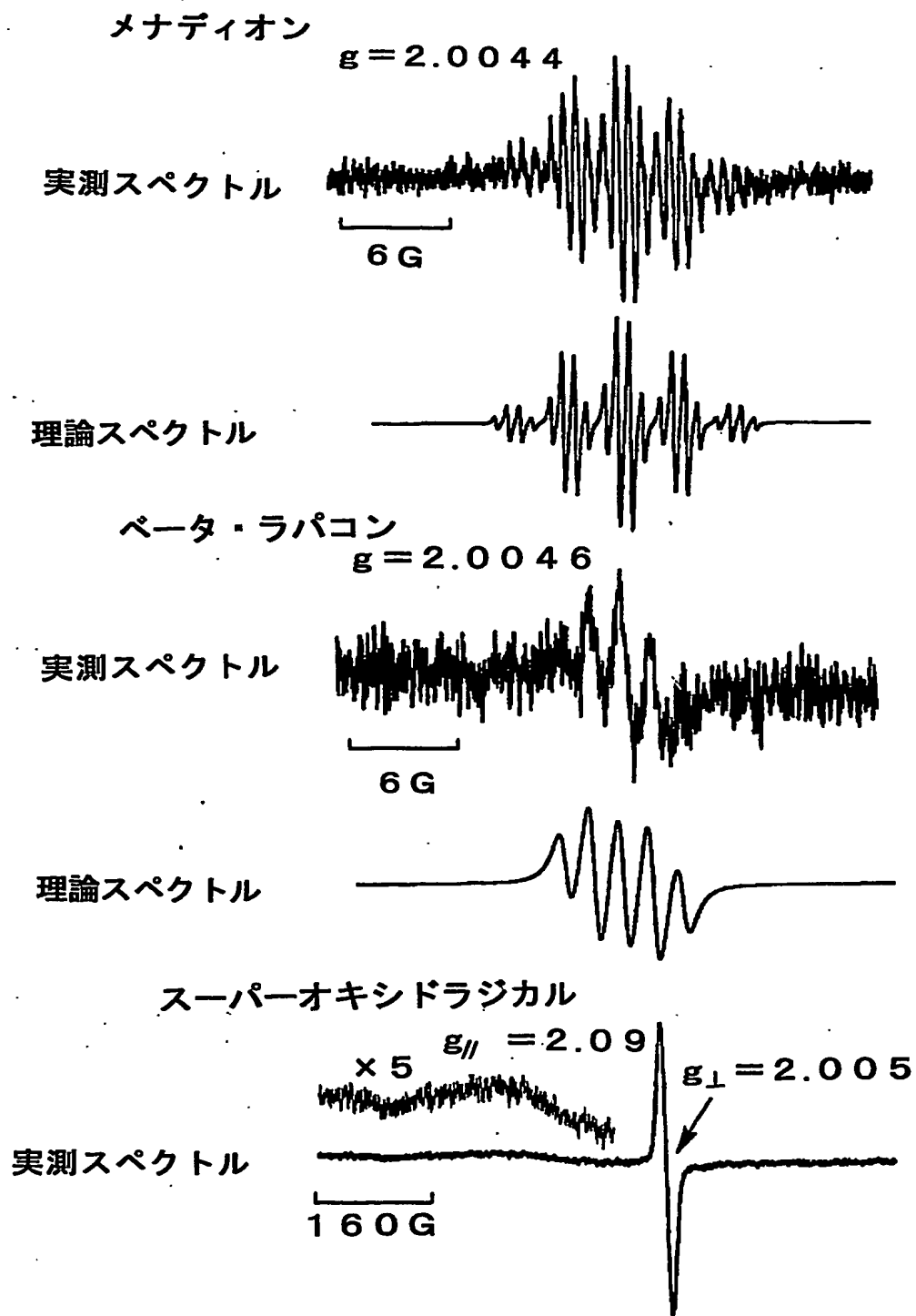
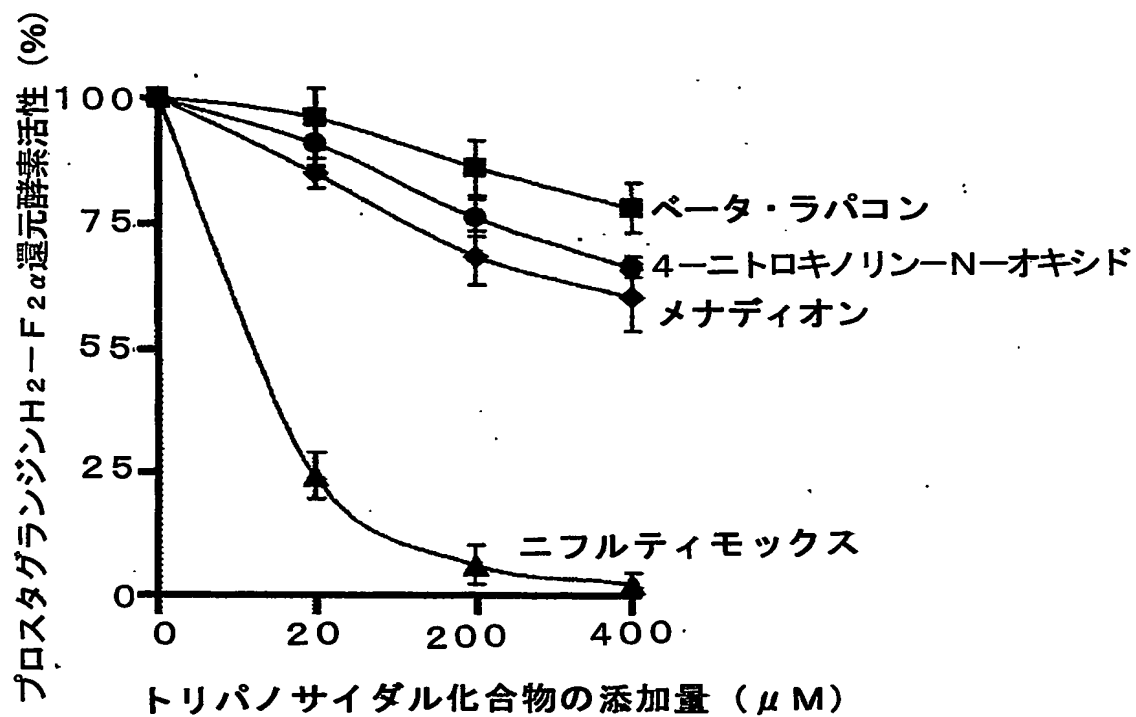
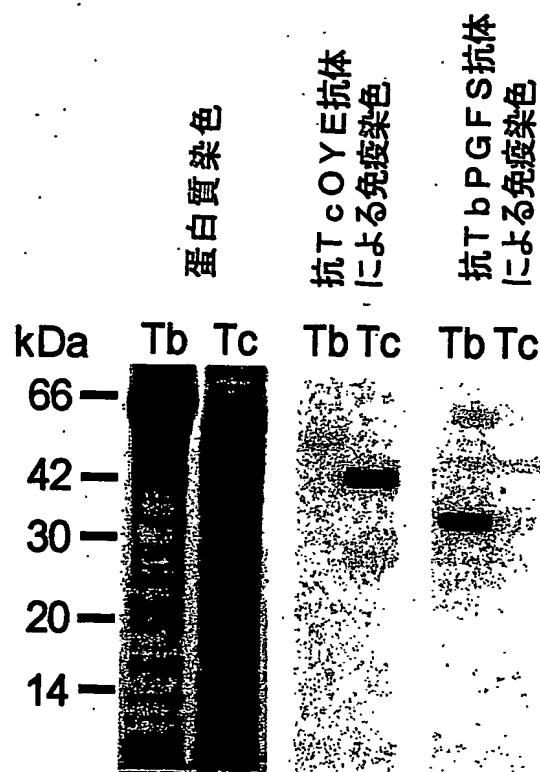


図 9



10/12

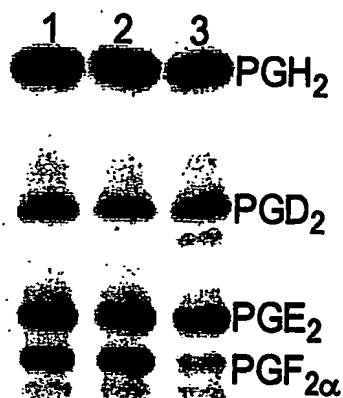
図 10



Tb: ブルーシトリパノソーマの粗抽出液

Tc: クルーズトリパノソーマの粗抽出液

図 1 1



1. コントロール IgG との反応後のクルージトリパノソーマ抽出液
2. 抗 Tb PGFS 抗体 との反応後のクルージトリパノソーマ抽出液
3. 抗 Tc OYE 抗体 との反応後のクルージトリパノソーマ抽出液

図 1 2

抗TcOYE抗体によるクルーズトリパノソーマの粗抽出液中のメナディオ、ベータ・ラパコン、ニフルティモックス、4-ニトロキノリン-N-オキシドの還元酵素活性の免疫沈降

還元酵素活性 (%) :				
サンプル	メナディオ	ベータ・ラパコン	ニフルティモックス	4-ニトロキノリン-N-オキシド
抗TcOYE抗体との 反応後のクルーズトリ パノソーマ抽出液	N. D.	10(±2)	N. D.	N. D.
抗TbPGFS抗体との 反応後のクルーズトリ パノソーマ抽出液	98(±8)	103(±3)	100(±5)	100(±10)
コントロール IgGとの 反応後のクルーズトリ パノソーマ抽出液	100(±4)	100(±6)	100(±10)	100(±6)

SEQUENCE LISTING

<110> Osaka Bioscience Institute

<110> JAPAN AS REPRESENTED BY THE DIRECTOR-GENERAL OF
NATIONAL INSTITUTE OF INFECTIOUS DISEASES

<120> Flavin protein from Trypanosoma cruzi, method for screening
exterminating agent for it and method for diagnosing infection
thereof

<130> 664102

<150> JP 2002-299284

<151> 2002-10-11

<160> 9

<210> 1

<211> 1140

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 1

```
atggcgacgt tccctgaact tctgcggccc ctcaaattgg ggcgctacac acttcgtaat   60
cggattatta tggctccctt gacgcgttgc caggcaacag aagatgatca tgtaccaagg   120
acggaatcga tgctgaagta ctacgaagac cgggcatctg caggtcttat cattgccgag   180
gcgacgatgg tccagccaaa ctacactggg ttctcacgg agcctggcat ttactccgat   240
gcgcagattg aggagtggag aaagatcgtg gacgcggtac acaaaaaggg tggccttata   300
ttcctgcaac tcattcacgc tggtcgagcc gggattccgg agaagatcct tcagcagtcg   360
```

aagagtgacc aggatcccct tgctgggcgc ctgcttgccg cgagtgccat tcccattaag 420
gaccatcgga ttcctgccta ttttgctgcg agcggagaaa aggagaccta cggtgtccca 480
gaggagctca cggatgacga agtccgggac ggtatcatcc cattgtttgt ggagggggcc 540
aaaaacgcc a tctttaaggc tgggtttgat ggcgttgaga ttcattggagc caacggctac 600
ttactggacg ccttttttcg cgaatcttcc aacaagcgcc agtccgggtcc gtacgccgga 660
acgaccatcg acacacgatg ccaactcatc tacgatgtca ccaaaagcgt ctgcgatgcc 720
gtgggaagtg accgtgtggg gctccgcata tcccactaa acggcgtgca tgggatgatt 780
gactcgaacc cggaggcact aaccaagcat ctatgcaaga aaattgagcc actttcgctt 840
gcctatctgc attacttgcg tggcgacatg gtcaaccagc agatttgtga cgttgtggcg 900
tgggttcgtg gaagttacag cgggtgtaaaa atatccaact tgcgtacga tttcgaagag 960
gcagaccagc aaatacggga aggaaaagtc gacgccgtgg cttttggcgc caagttcatt 1020
gcgaaccccg atctcgttga aagggcccaa caaaactggc ccctcaacga gccgcgacca 1080
gaaacatact acacaagaac agcagtcgga tacaacgatt acccgacgta caacaaataa 1140

<210> 2

<211> 379

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 2

Met Ala Thr Phe Pro Glu Leu Leu Arg Pro Leu Lys Leu Gly Arg Tyr

1 5 10 15

Thr Leu Arg Asn Arg Ile Ile Met Ala Pro Leu Thr Arg Cys Gln Ala

20 25 30

Thr Glu Asp Asp His Val Pro Arg Thr Glu Ser Met Leu Lys Tyr Tyr

35 40 45

Glu Asp Arg Ala Ser Ala Gly Leu Ile Ile Ala Glu Ala Thr Met Val

50 55 60

Gln Pro Asn Tyr Thr Gly Phe Leu Thr Glu Pro Gly Ile Tyr Ser Asp

65 70 75 80

3/6

Ala Gln Ile Glu Glu Trp Arg Lys Ile Val Asp Ala Val His Lys Lys
85 90 95

Gly Gly Leu Ile Phe Leu Gln Leu Ile His Ala Gly Arg Ala Gly Ile
100 105 110

Pro Glu Lys Ile Leu Gln Gln Ser Lys Ser Asp Gln Asp Pro Leu Ala
115 120 125

Gly Arg Leu Leu Ala Ala Ser Ala Ile Pro Ile Lys Asp His Arg Ile
130 135 140

Pro Ala Tyr Phe Ala Ala Ser Gly Glu Lys Glu Thr Tyr Gly Val Pro
145 150 155 160

Glu Glu Leu Thr Asp Asp Glu Val Arg Asp Gly Ile Ile Pro Leu Phe
165 170 175

Val Glu Gly Ala Lys Asn Ala Ile Phe Lys Ala Gly Phe Asp Gly Val
180 185 190

Glu Ile His Gly Ala Asn Gly Tyr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Arg Glu
195 200 205

Ser Ser Asn Lys Arg Gln Ser Gly Pro Tyr Ala Gly Thr Thr Ile Asp
210 215 220

Thr Arg Cys Gln Leu Ile Tyr Asp Val Thr Lys Ser Val Cys Asp Ala
225 230 235 240

Val Gly Ser Asp Arg Val Gly Leu Arg Ile Ser Pro Leu Asn Gly Val
245 250 255

His Gly Met Ile Asp Ser Asn Pro Glu Ala Leu Thr Lys His Leu Cys
260 265 270

Lys Lys Ile Glu Pro Leu Ser Leu Ala Tyr Leu His Tyr Leu Arg Gly
275 280 285

Asp Met Val Asn Gln Gln Ile Gly Asp Val Val Ala Trp Val Arg Gly
290 295 300

Ser Tyr Ser Gly Val Lys Ile Ser Asn Leu Arg Tyr Asp Phe Glu Glu

4/6

305 310 315 320
Ala Asp Gln Gln Ile Arg Glu Gly Lys Val Asp Ala Val Ala Phe Gly
 325 330 335
Ala Lys Phe Ile Ala Asn Pro Asp Leu Val Glu Arg Ala Gln Gln Asn
 340 345 350
Trp Pro Leu Asn Glu Pro Arg Pro Glu Thr Tyr Tyr Thr Arg Thr Ala
 355 360 365
Val Gly Tyr Asn Asp Tyr Pro Thr Tyr Asn Lys
 370 375

<210> 3

<211> 10

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 3

Asn Arg Ile Ile Met Ala Pro Leu Thr Arg
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 4

Asp His Arg Ile Pro Val Tyr Phe Ala Ala
1 5 10

<210> 5

5/6

<211> 10

<212> PRT

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 5

Ile Ser Asn Leu Arg Tyr Asp Phe Glu Glu

1

5

10

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 6

cggaattcat ggcgacgttc cctgaacttc

30

<210> 7

<211> 30

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 7

ccgctcgagt tatttggtgt acgtcgggta

30

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 8

atggcgacgt tccctgaact cc

22

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Trypanosoma cruzi

<400> 9

ttatttggtg tacgtcgggt a

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13043

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/68, C12Q1/26, C07K16/40,
G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/569

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/68, C12Q1/26, C07K16/40,
G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	Kubata B.K. et al., A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by Trypanosoma cruzi, J.Exp.Med., 2002, Vol.196, No.9, pages 1241-51	1-7
A	Kubata B.K. et al., Identification of a novel prostaglandin F2 α synthase in Trypanosoma brucei, J.Exp.Med., 2000, Vol.192, No.9, pages 1327-37	1-7
A	Derek W. et al., The Genome of the Natural Genetic Engineer Agrobacterium tumefaciens C58, Science, 2001, Vol.294, pages 2317 to 2323	1-7

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
05 December, 2003 (05.12.03)

Date of mailing of the international search report
16 December, 2003 (16.12.03)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/13043

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 8 to 10

because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The invention as set forth in these claims involve methods for diagnosis of the human body .

2. ☐ Claims Nos.:

because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:

because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/68; C12Q1/26, C07K16/40, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/569

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N9/02, C12N15/53, C12Q1/68, C12Q1/26, C07K16/40, G01N33/15, G01N33/50, G01N33/53, G01N33/566, G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus (JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Kubata B. K. et al., A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by Trypanosoma cruzi, J. Exp. Med., 2002, Vol.196, No.9, pages 1241-51	1-7
A	Kubata B. K. et al., Identification of a novel prostaglandin F2 α synthase in Trypanosoma brucei, J. Exp. Med., 2000, Vol.192, No.9, pages 1327-37	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

05.12.03

国際調査報告の発送日

16.12.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

高堀 栄二



4N

3126

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Derek W. et al., The Genome of the Natural Genetic Engineer Agrobacterium tumefaciens C58, Science, 2001, Vol.294, pages 2317-2323	1 - 7

第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT 17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 8-10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、

人の診断方法を含むものである。

2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。